

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

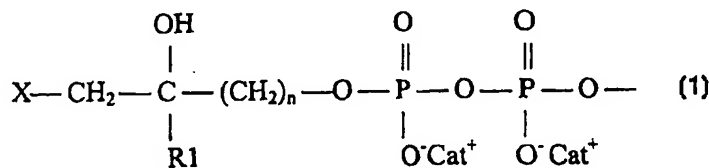


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : C07F 9/09, C07H 19/10, C12N 5/06, A61K 31/66, 49/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/12516</b> (43) Date de publication internationale: 9 mars 2000 (09.03.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02058 (22) Date de dépôt international: 27 août 1999 (27.08.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/10913 1er septembre 1998 (01.09.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BELMANT, Christian [FR/FR]; 16, rue Marcel Pagnol, F-31700 Blagnac (FR). FOURNIE, Jean-Jacques [FR/FR]; 8, Jardins de la Soulanc, F-31450 Corronsac (FR). BONNEVILLE, Marc [FR/FR]; Route de la Massonière, F-44120 Vertou (FR). PEYRAT, Marie-Alix [FR/FR]; 4, place des Libertés, F-44230 Saint-Sebastien sur Loire (FR). (74) Mandataire: CABINET BARRE LAFORGUE &amp; ASSOCIES; 95, Rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</p>

(54) Title: PHOSPHOHALOHYDRINS, METHOD FOR MAKING SAME AND USES

(54) Titre: PHOSPHOHALOHYDRINES, PROCEDE DE FABRICATION ET APPLICATIONS



(57) Abstract

The invention concerns compounds comprising at least a phosphohalohydrin group of formula (1) wherein: X is a halogen selected among I, Br, Cl; R1 is selected among -CH<sub>3</sub> and -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>; Cat<sup>+</sup> is an organic or mineral cation; and n is an integer ranging between 2 and 20. The invention also concerns their preparation methods and applications, particularly in therapy and for activating Tγ9δ lymphocytes of primates.

(57) Abrégé

L'invention concerne des composés comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule (1), où X est un halogène choisi parmi I, Br, Cl, R1 est choisi parmi -CH<sub>3</sub> et -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, Cat<sup>+</sup> est un cation organique ou minéral, et n est un nombre entier compris entre 2 et 20, leurs procédés de préparation et leurs applications, notamment thérapeutiques et pour activer les lymphocytes Tγ9δ des primates.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PHOSPHOHALOHYDRINES, PROCEDE DE FABRICATION ET APPLICATIONS

L'invention concerne de nouveaux composés  
5 phosphohalohydrines, leur procédé de fabrication et leurs applications pour la stimulation des lymphocytes  $\gamma\delta$  porteurs de récepteurs TCR à régions variables  $V\gamma 9$  et  $V\delta 2$ .

Les lymphocytes  $\gamma\delta$  des primates présents dans le sang périphérique (humains, singes) représentent, chez l'individu sain, habituellement  
10 de 1 à 5% des lymphocytes du sang et jouent un rôle dans le système immunitaire. Il a été démontré qu'ils reconnaissent leurs ligands antigéniques par une interaction directe avec l'antigène, sans présentation par les molécules du CMH d'une cellule présentatrice. Les lymphocytes  $\gamma\delta$  (parfois aussi désignés lymphocytes  $\gamma 2\delta 2$ ) sont des lymphocytes  $\gamma\delta$  porteurs de récepteurs TCR à  
15 régions variables  $V\gamma 9$  et  $V\delta 2$ . Ils représentent la majorité des lymphocytes  $\gamma\delta$  dans le sang humain.

Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes  $\gamma\delta$  exercent une puissante activité cytotoxique non restreinte par le CMH, particulièrement efficace pour tuer divers types de cellules, notamment des cellules pathogènes. Il  
20 peut s'agir de cellules infectées par des virus (" $\gamma\delta$  T cell activation or anergy during infections : the role of nonpeptidic TCR ligands and HLA class I molecules" Fabrizio POCCIA *et al*, Journal of Leukocyte Biology, 62, 1997, p. 1-5), ou par d'autres parasites intracellulaires tels que les mycobactéries ("The antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine is an attenuated  
25 Mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic Antigens for human  $\gamma\delta$  T cells" Patricia CONSTANT *et al*, Infection and Immunity, vol. 63, n° 12, Dec. 1995, p. 4628-4633) ; ou les protozoaires ("*Plasmodium falciparum* stimuli for human  $\gamma\delta$  T Cells are related to phosphorylated Antigens of mycobacteria" Charlotte BEHR *et al*, Infection and Immunity, Vol. 64, n° 8, 1996, p. 2892-  
30 2896). Il peut aussi s'agir de cellules cancéreuses ("CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both antiviral and antitumoral responses of

polyclonal phosphoantigen-reactive V $\gamma$ 9 V $\delta$ 2 T lymphocytes" Fabrizio POCCIA *et al*, Journal of Immunology, 159, p. 6009-6015 ; "Stimulation of  $\gamma\delta$  T cells by phosphoantigens" Jean-Jacques FOURNIE, Marc BONNEVILLE, Res. Immunol., 66<sup>th</sup> FORUM IN IMMUNOLOGY, 147, P. 338-347).

5 Il a été démontré que les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 humains réagissent dans le cas d'une infection mycobactérienne à quatre molécules naturelles non peptidiques de structure phosphatée, désignées phosphoantigènes, qui présentent une activité de stimulation pour une concentration de l'ordre de 1 à 5 nM (nanomolaire) (WO-95/20673 et "Stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells by  
10 nonpeptidic Mycobacterial ligands" Patricia CONSTANT *et al*, Science, 264, p. 267-270).

Ces antigènes naturels ne sont pas complètement identifiés. Certains auteurs les ont présentés, à tort, comme des dérivés alcènes du pyrophosphate, notamment l'isopentényl pyrophosphate IPP (US-5 639 653 et  
15 "Natural and Synthetic nonpeptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells", Yoshimasa TANAKA *et al*, Nature, 375, 1995, p. 155-158). Néanmoins, il est maintenant démontré qu'aucun de ces prénylpyrophosphates n'est actif à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Les meilleurs résultats obtenus n'arrivent pas à démontrer une activité à moins de 3  $\mu$ M pour l'IPP, et à 0,3  $\mu$ M  
20 pour le diméthylallyl-UTP et le 3-méthyl-2-hexène pyrophosphate. La concentration minimale d'activité de ces composés est donc, au mieux, de l'ordre de 100 fois plus importante que celle des phosphoantigènes naturels.

En ce qui concerne l'IPP, il est à noter en particulier que les dernières publications mentionnées ci-dessus commettent une erreur en déduisant  
25 la structure du radical isopentényl à partir de la seule analyse du spectre de masse et de la mise en évidence d'une certaine bioactivité. En effet, outre le fait que le composé analysé dans les publications n'était pas purifié et qu'un spectre de masse ne peut pas identifier des espèces non chargées, on peut démontrer qu'il existe en fait plusieurs milliers de structures chimiques différentes pouvant avoir  
30 cette même masse moléculaire et être un substituant du pyrophosphate dans ces molécules.

Le fait que la concentration minimale d'activité de l'IPP soit beaucoup plus élevée (de l'ordre de 1000 fois) et que l'intensité des réponses lymphocytaires T $\gamma$ 982 obtenues soit beaucoup plus faible que celles des phosphoantigènes naturels démontre que l'IPP n'est pas l'un de ces phosphoantigènes naturels ("A novel nucleotide-containing antigen for human blood  $\gamma\delta$  T lymphocytes", Y. Poquet *et al*, Eur. J. Immunol. 1996, 26, p. 2344-2349). Cela est d'ailleurs confirmé par de nombreuses autres constatations : on ne trouve pas d'IPP en concentration suffisante dans les extraits mycobactériens stimulant les lymphocytes T $\gamma$ 982 ; l'IPP n'a pas les mêmes caractéristiques chromatographiques (HPAEC) selon : "High pH anion exchange chromatographic analysis of phosphorylated compounds : application to isolation and characterization of non peptide mycobacterial antigens", Y. Poquet *et al*, Anal. Biochem, 243 n° 1, 1996, p. 119-126 que les phosphoantigènes naturels ; l'IPP et les autres isoprénoïdes naturels sont produits par toutes les cellules vivantes, qui ne stimulent pourtant pas les lymphocytes T $\gamma$ 982.

Par ailleurs, on sait que les substances dont la bioactivité est de l'ordre de ou supérieure à 1  $\mu$ M ne sont que rarement compatibles avec les contraintes de rentabilité d'une exploitation à l'échelle industrielle. Ainsi, les phosphoantigènes synthétiques proposés jusqu'à maintenant ne sont pas exploitables à l'échelle industrielle dans des conditions économiques acceptables.

Les phosphoantigènes naturels, quant à eux, ne peuvent être produits qu'en très faibles quantités (WO 95/20673), et leur structure chimique exacte restant encore indéterminée, il n'est pas possible de les produire par synthèse. Il n'est donc pas non plus possible d'envisager une exploitation à l'échelle industrielle dans des conditions économiques, malgré leur grand intérêt thérapeutique démontré.

L'invention vise donc à proposer des nouveaux composés chimiques qui soient activateurs des lymphocytes T $\gamma$ 982 pour une concentration minimale d'activation inférieure à 100nM, notamment de l'ordre de 1 nM.

L'invention vise aussi à proposer des composés pouvant être couplés à un grand nombre de groupements organiques, notamment à des

groupements peptidiques naturels ou synthétiques, de façon à permettre l'obtention de composés multifonctionnels.

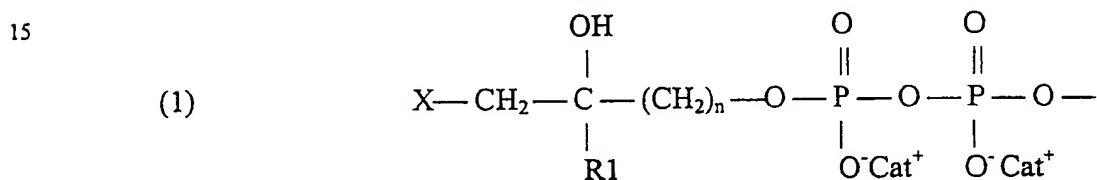
L'invention vise aussi à proposer de tels composés dont la synthèse est simple, quantitative et peu coûteuse, c'est-à-dire compatible avec les contraintes économiques d'une production à l'échelle industrielle.

L'invention vise aussi à ce titre à proposer une voie de synthèse avantageuse de ces composés.

L'invention vise aussi à proposer un procédé de fabrication de composés selon l'invention.

L'invention vise aussi à proposer des applications des composés selon l'invention à titre d'activateur des lymphocytes Ty982, et en particulier des applications thérapeutiques des composés selon l'invention.

L'invention concerne donc des composés comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine, de formule :



où X est un halogène choisi parmi l'iode, le brome et le chlore,

R1 est choisi parmi  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,

Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,

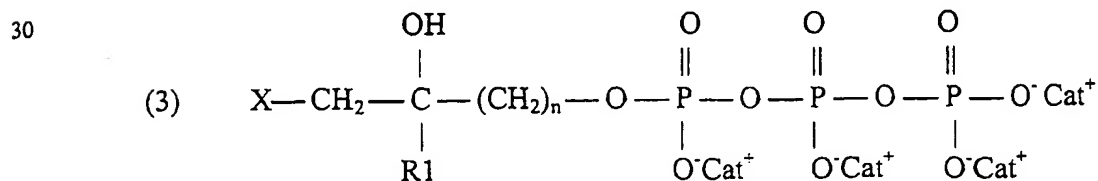
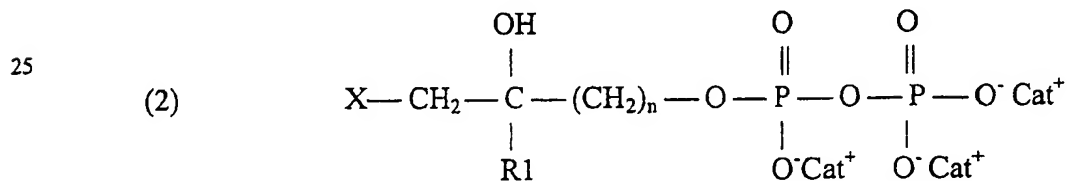
et n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

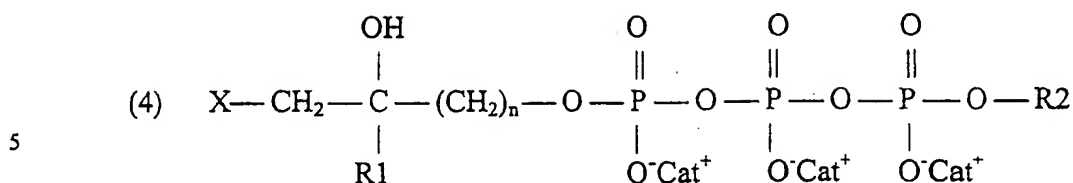
Un composé selon l'invention peut comprendre notamment un ou plusieurs groupement(s) phosphohalohydrine(s) choisi(s) parmi les esters des groupements suivants (nomenclature IUPAC), ou parmi les composés formés de ces groupements :

3-(halométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate, 3-(halométhyl)-3-pentanol-1-yl-diphosphate, 4-(halométhyl)-4-pentanol-1-yl-diphosphate, 4-(halométhyl)-4-hexanol-1-yl-diphosphate, 5-(halométhyl)-5-hexanol-1-yl-diphosphate, 5-(halométhyl)-4-heptanol-1-yl-diphosphate, 6-(halométhyl)-6-heptanol-1-yl-diphosphate, 6-(halométhyl)-6-octanol-1-yl-diphosphate, 7-(halométhyl)-7-

octanol-1-yl-diphosphate, 7-(halométhyl)-7-nonanol-1-yl-diphosphate, 8-  
 (halométhyl)-8-nonanol-1-yl-diphosphate, 8-(halométhyl)-8-décanol-1-yl-  
 diphosphate, 9-(halométhyl)-9-décanol-1-yl-diphosphate, 9-(halométhyl)-9-  
 undécanol-1-yl-diphosphate, 10-(halométhyl)-10-undécanol-1-yl-diphosphate,  
 5 10-(halométhyl)-10-dodécanol-1-yl-diphosphate, 11-(halométhyl)-11-dodécanol-  
 1-yl-diphosphate, 11-(halométhyl)-11-tridécanol-1-yl-diphosphate, 12-  
 (halométhyl)-12-tridécanol-1-yl-diphosphate, 12-(halométhyl)-12-  
 tétradécanol-1-yl-diphosphate, 13-(halométhyl)-13-tétradécanol-1-  
 yl-diphosphate, 13-(halométhyl)-13-pentadécanol-1-yl-diphosphate, 14-  
 10 (halométhyl)-14-pentadécanol-1-yl-diphosphate, 14-(halométhyl)-14-  
 hexadécanol-1-yl-diphosphate, 15-(halométhyl)-15-hexadécanol-1-yl-  
 diphosphate, 15-(halométhyl)-15-heptadécanol-1-yl-diphosphate, 16-  
 (halométhyl)-16-heptadécanol-1-yl-diphosphate, 16-(halométhyl)-16-  
 octadécanol-1-yl-diphosphate, 17-(halométhyl)-17-octadécanol-1-yl-diphosphate,  
 15 17-(halométhyl)-17-nonadécanol-1-yl-diphosphate, 18-(halométhyl)-18-  
 nonadécanol-1-yl-diphosphate, 18-(halométhyl)-18-eicosanol-1-yl-diphosphate,  
 19-(halométhyl)-19-eicosanol-1-yl-diphosphate, 19-(halométhyl)-11-  
 heneicosanol-1-yl-diphosphate, 20-(halométhyl)-20-heneicosanol-1-  
 yl-diphosphate, 20-(halométhyl)-20-docosanol-1-yl-diphosphate, 21-  
 20 (halométhyl)-21-docosanol-1-yl-diphosphate, 21-(halométhyl)-21-tricosanol-1-  
 yl-diphosphate.

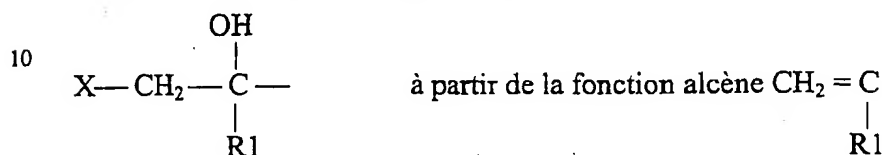
Parmi les composés selon l'invention, on peut citer les  
 composés phosphohalohydrines répondant à l'une des formules suivantes :





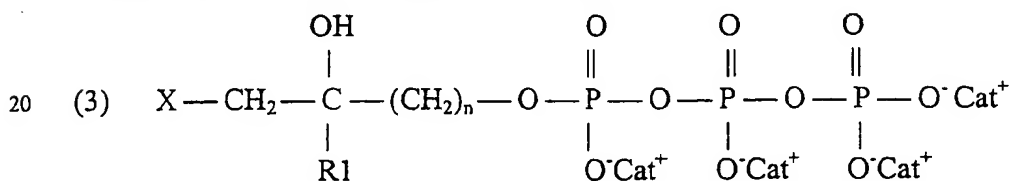
où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé :

- des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine



15 et de l'halogène X<sub>2</sub> en présence d'eau ;

- et des substituants pour lesquels il existe un composé R2-O-Y non réactif sur la fonction halohydrine du composé de formule :



et choisis pour que R2-O-Y puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé (3) pour obtenir le composé (4).

25 Avantageusement, lesdits composés selon l'invention sont caractérisés en ce que n = 2 et R1 est CH<sub>3</sub>.

Les composés selon l'invention comprennent avantageusement en outre au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des époxydes et des halohydrines.

35 En particulier, l'invention s'étend aux composés phosphohalohydrines selon la formule (4) ci-dessus dans lesquels R2 est choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines,

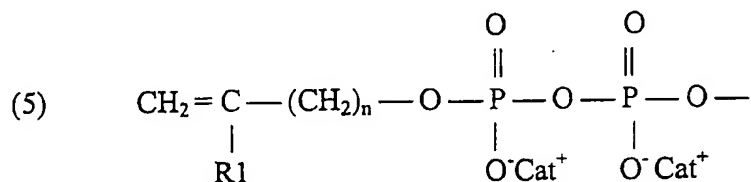


des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des phosphohalohydrines selon la formule (1), des aldéhydes, des époxydes et des halohydrines.

L'invention s'étend aussi aux composés dont la structure incorpore plusieurs groupements conformes à la formule (1), identiques ou différents, par exemple des monomères, polymères, oligomères ou dendrimères, ou plus généralement des molécules à plusieurs branches phosphatées conformes à la formule (1).

Il est à noter que les composés selon l'invention sont des esters (monoesters ou diesters) d'acide phosphorique (ce terme englobant les acides où le phosphore est au degré d'oxydation V, à savoir l'acide orthophosphorique, l'acide pyrophosphorique, l'acide métaphosphorique, l'acide triphosphorique, les autres acides polyphosphoriques).

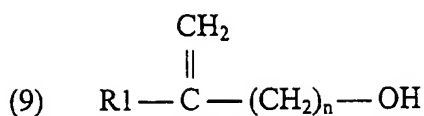
L'invention s'étend à un procédé de fabrication des composés selon l'invention. Selon l'invention, on fait réagir l'halogène  $X_2$  en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de formule :



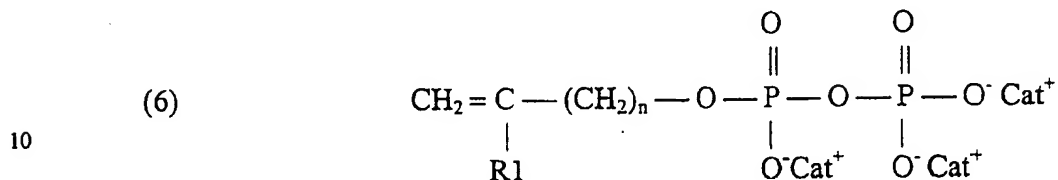
25

Avantageusement et selon l'invention, on fait réagir un sel formé dudit composé de départ en milieu aqueux ou hydroalcoolique, à pH neutre, à une température inférieure à 30°C, par mélange avec une solution aqueuse de l'halogène X<sub>2</sub>. Avantageusement et selon l'invention, on effectue la réaction sous pression atmosphérique à une température comprise entre 0°C et 25°C.

Les composés de départ peuvent être eux-mêmes obtenus à partir de l'alcool :

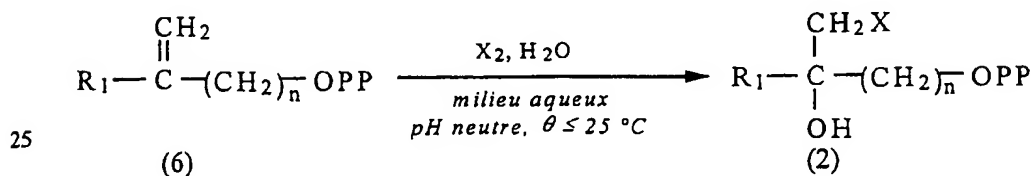
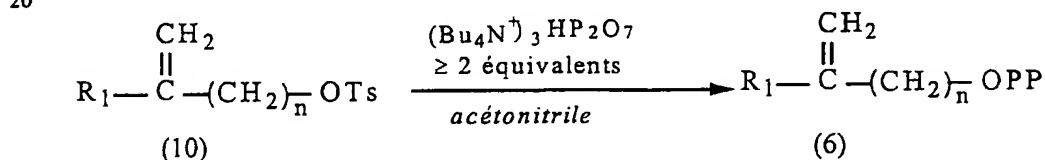
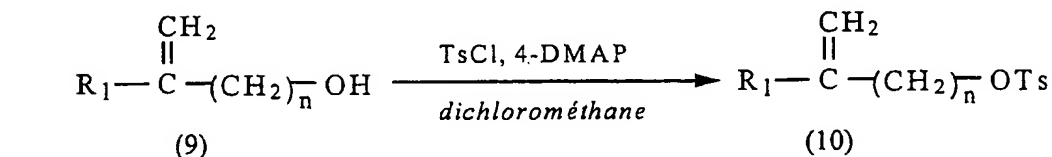


5 Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ est un sel de formule :



On obtient alors le composé pyrophosphohalohydrine selon la formule (2).

15 Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du composé (2) à partir de l'alcool (9) est le suivant :



où TsCl est le chlorure de tosylo,

4-DMAP est le 4-diméthylaminopyridine,

30  $\text{Bu}_4\text{N}^+$  est le tétrabutylammonium,

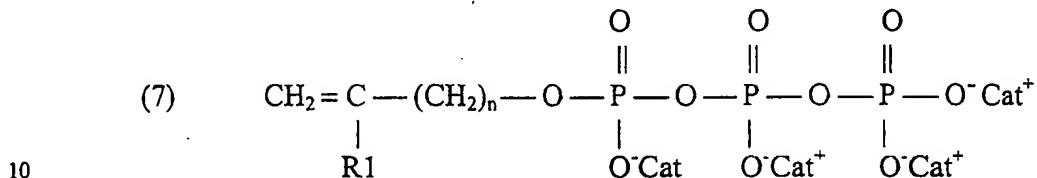
$(\text{Bu}_4\text{N}^+)_3\text{HP}_2\text{O}_7$  est le tris (tétra n-butylammonium) hydrogènypyrophosphate,

PP symbolise le groupement pyrophosphate.

Les réactions permettant d'obtenir le composé (6) à partir de l'alcool (9) peuvent être effectuées comme décrit par : DAVISSON V.J. *et al.*

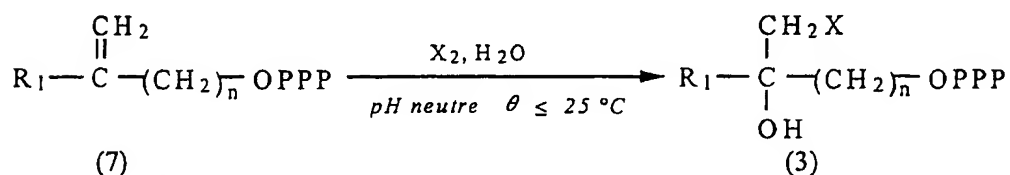
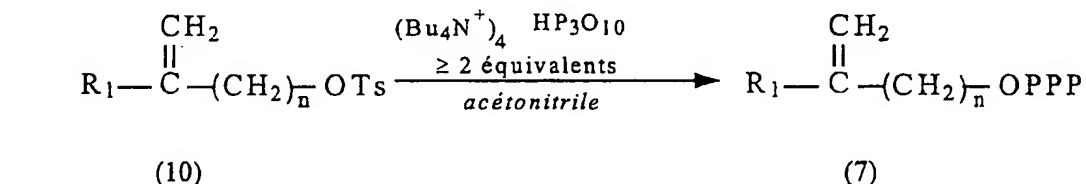
"Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols" J. Org. Chem 1986, 51,4768-4779, et DAVISSON V.J. *et al.* "Synthesis of Allylic and Homoallylic Isoprenoid Pyrophosphates" Methods in Enzymology, 1984, 110, 130-144.

Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ  
est un sel de formule :



On obtient alors le composé triphosphohalohydrine selon la formule (3).

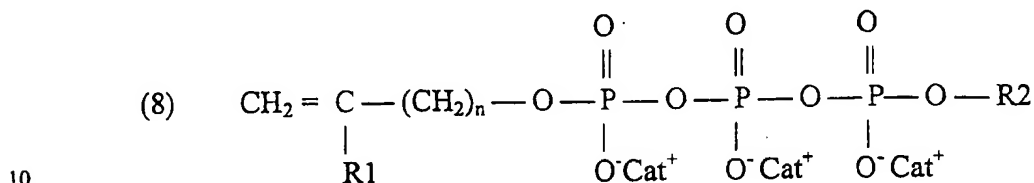
Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du  
composé (3) à partir de l'alcool (9) est le suivant :



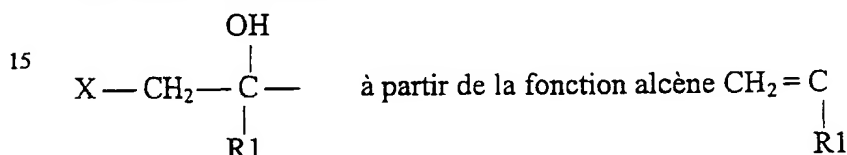
où PPP est le groupement triphosphate,  
(Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)<sub>4</sub>HP<sub>3</sub>O<sub>10</sub> est le tétrakis (tétra n-butylammonium)  
hydrogènotriphosphate.

Le composé (10) est obtenu à partir de l'alcool (9) comme  
indiqué précédemment. La réaction permettant d'obtenir le composé (7) à partir  
du composé (10) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles  
décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al* ou dans DAVISSON V.J. *et al* "Synthesis of Nucleotide 5'-Diphosphates from (5'-O-Tosyl Nucleosides" J.  
Org. Chem. 1987, 52, 1794-1801.

Avantageusement et selon l'invention, dans une première variante permettant d'obtenir un composé selon l'invention de formule (4), on peut effectuer le procédé de fabrication selon l'invention mentionné ci-dessus (réaction de  $X_2$  en présence d'eau sur une fonction alcène phosphatée) en prenant,  
 5 à titre de composé de départ, un sel de formule :



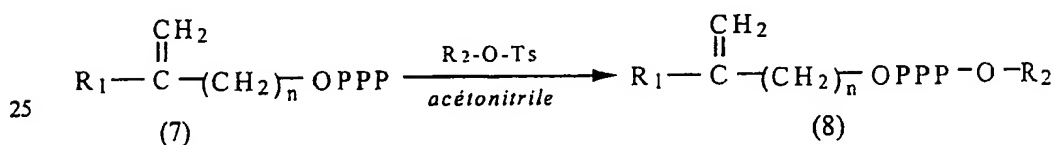
où  $R_2$  est un substituant organique ou minéral adapté pour ne pas empêcher la formation de la fonction halohydrine



20 et de l'halogène  $X_2$  en présence d'eau.

Le composé de départ (8) peut lui-même être préparé selon l'un des schémas réactionnels suivants :

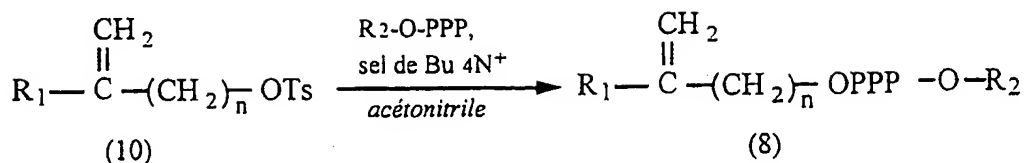
- Schéma réactionnel 1 :



où Ts est le tosyle.

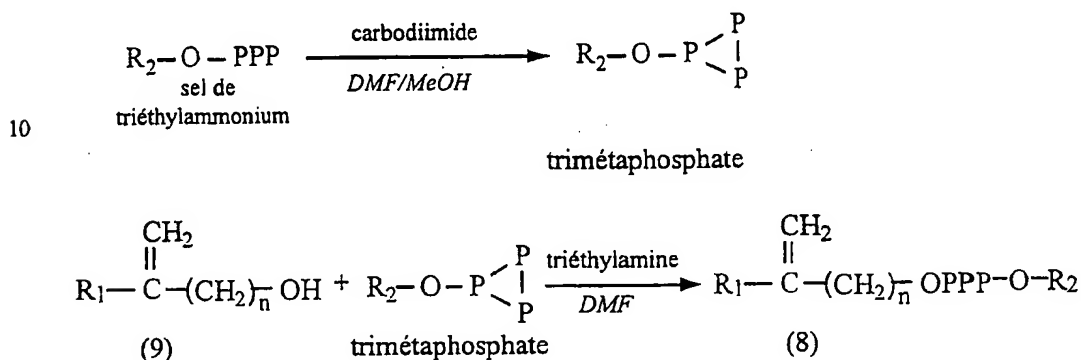
Le composé (7) peut être obtenu comme indiqué précédemment à partir de l'alcool (9) et du composé intermédiaire (10). La réaction permettant d'obtenir le composé (8) à partir du composé (7) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce schéma peut être utilisé lorsque  $R_2\text{-O-Ts}$  est commercialement disponible.

35 - Schéma réactionnel 2 :



Le composé intermédiaire (10) peut être obtenu comme  
indiqué précédemment à partir de l'alcool (9). La réaction permettant d'obtenir le  
composé (8) à partir du composé (7) peut être effectuée dans des conditions  
semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce  
schéma peut être utilisé lorsque R2-O-PPP est commercialement disponible.

- Schéma réactionnel 3 :



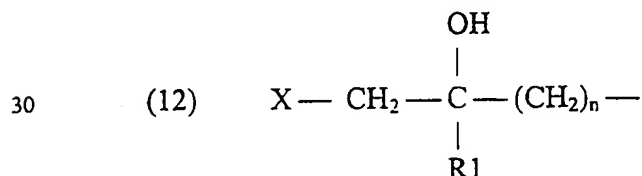
où DMF est le diméthylformamide,

MeOH est le méthanol.

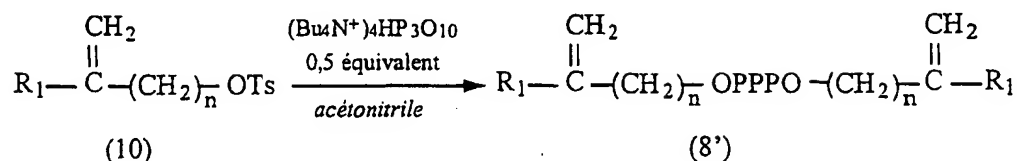
Ce schéma réactionnel 3 peut être mis en œuvre dans des  
conditions similaires à celles décrites dans D.G. KNORRE *et al* "General method  
for the synthesis of ATP gamma derivatives" Febs letters, 1976, 70, 105-108.

Ce schéma réactionnel 3 n'est pas utilisable lorsque R2  
comporte une fonction réactive au carbodiimide (carboxylate, triphosphate...).  
Elle est par contre avantageuse lorsque R2-O-PPP est commercialement  
disponible.

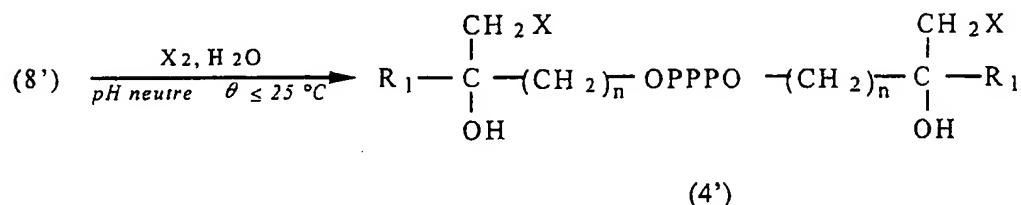
Dans le cas particulier où R2- est lui-même un groupement  
halohydrine de formule :



on peut utiliser le schéma réactionnel suivant :



5

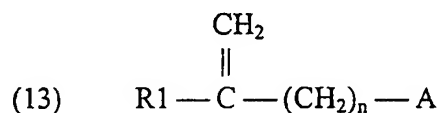


(4')

Ce composé (4') est un cas particulier de composé selon l'invention de formule (4).

Il est à noter que dans toutes ces réactions, l'acétonitrile peut être remplacé par tout autre solvant dipolaire aprotique (diméthylformamide DMF, diméthylsulfoxyde DMSO...).

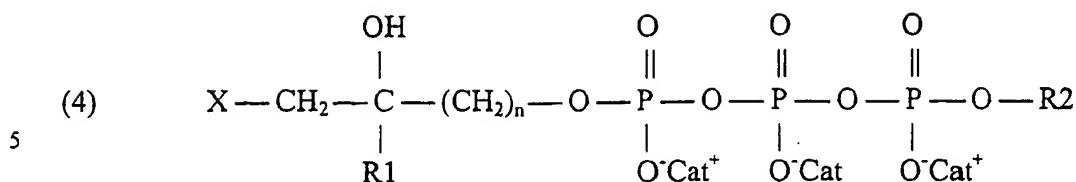
Il est à noter qu'à la place du composé intermédiaire (10) pour la préparation des composés (2), (3) et (4'), et dans le cas où  $n \neq 2$ , on peut aussi utiliser le composé chlorure ou bromure correspondant de formule :



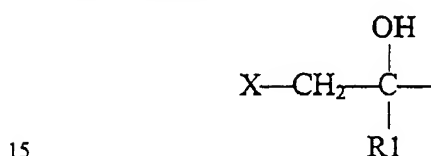
où A est le chlore ou le brome.

Les alcools (9) sont commercialement disponibles ou peuvent être aisément obtenus par une réaction de Grignard bien connue entre un organomagnésien d'alcényle et le formaldéhyde ou l'oxyde d'éthylène.

Dans une deuxième variante applicable dans certains cas, pour préparer un composé selon la formule (4), on pourrait faire réagir le composé triphosphate selon l'invention de formule (3) à partir d'un sel soluble en milieu organique tel qu'un sel de  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ , dans une étape ultérieure avec un composé  $\text{R}_2\text{-O-Y}$ , où  $\text{-O-Y}$  est un groupement partant et  $\text{R}_2$  est un substituant organique ou minéral choisis pour que  $\text{R}_2\text{-O-Y}$  puisse former, par réaction sur le composé (3), le composé selon l'invention de formule :



Pour pouvoir former ainsi le composé selon la formule (4), le composé R<sub>2</sub>-O-Y ne doit notamment pas être réactif sur la fonction halohydrine :



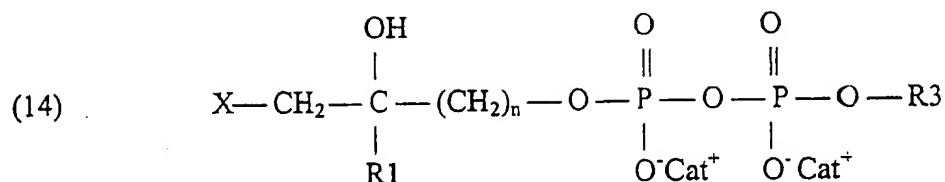
En outre, R<sub>2</sub>-O-Y doit réagir sur le phosphate terminal du composé (3) pour former le composé (4).

La réaction du composé de formule (3) sur R<sub>2</sub>-O-Y est une substitution nucléophile. Cette réaction est en particulier possible et avantageuse pour R<sub>2</sub> choisi dans le groupe formé des alkyles et des alcènes. Y est choisi de telle sorte que R<sub>2</sub>-O-Y puisse donner le composé (4) par substitution nucléophile. Y est par exemple choisi parmi le tosyle, le brosylle et le triflyle.

Ainsi, un composé selon l'invention peut être bifonctionnel ou multifonctionnel. La(les) fonction(s) phosphohalohydrine(s) procure(nt) une propriété antigénique spécifique recherchée vis-à-vis des lymphocytes T<sub>9</sub>δ<sub>2</sub>, et R<sub>2</sub> ou les autres groupements fonctionnels du composé peuvent présenter d'autres propriétés, notamment thérapeutiques.

Dans le cas d'un composé selon l'invention ayant plusieurs groupements phosphohalohydrines conformes à la formule (1), il suffit soit de partir d'un composé de départ ayant le nombre correspondant de groupements alcènes phosphatés de formule (5) et la structure chimique correspondante, soit d'utiliser le composé de formule (3) et de le faire réagir avec un composé intermédiaire R<sub>2</sub>-O-Y ayant le nombre correspondant de fonctions -O-Y.

L'invention concerne aussi en particulier les nouveaux composés β-esters de phosphohalohydrines de formule :



où X est un halogène choisi parmi l'iode, le brome et le chlore,

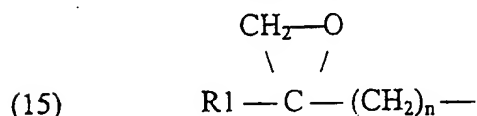
R1 est choisi parmi  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,

Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,

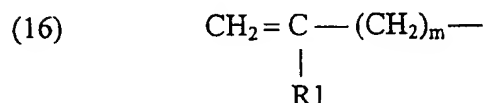
n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

R3- est choisi parmi :

- un groupement halohydrine de formule (12),
- un groupement époxyde de formule :



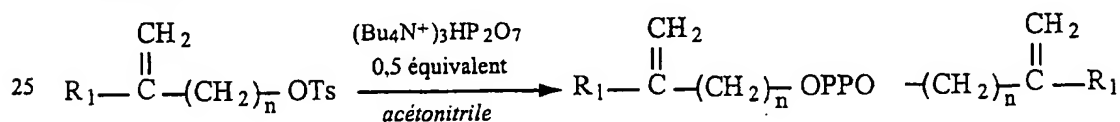
- un groupement alcène de formule :



m étant un nombre entier compris entre 1 et 20.

Pour obtenir ces composés (14), on réalise tout d'abord

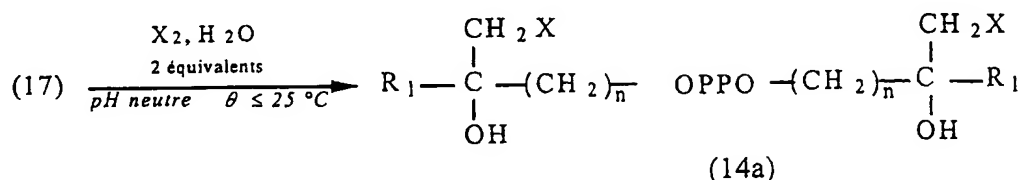
l'étape initiale suivante :



(10)

(17)

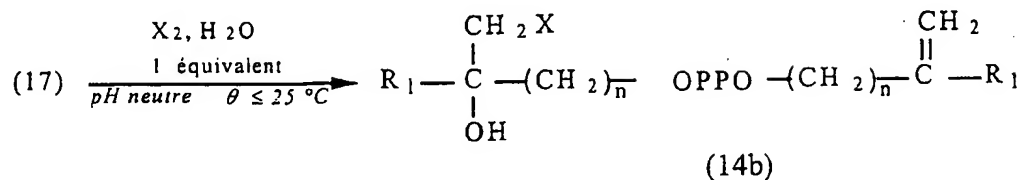
Ensuite, pour obtenir le composé symétrique (14a) diphosphodihalohydrine, on procède de la façon suivante :



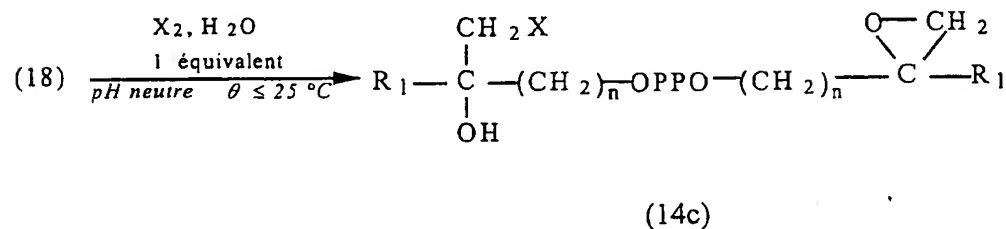
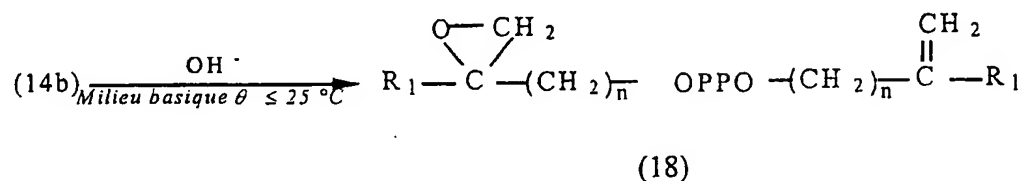
Pour obtenir le composé  $\alpha,\beta$  phosphodiester halohydrine-alcène



asymétrique (14b), on procède de la façon suivante :



5 Pour obtenir le composé  $\alpha, \beta$  phosphodiester halohydrine-époxyde asymétrique (14c), on procède de la façon suivante :



10 L'invention s'étend également aux utilisations des composés selon l'invention -notamment les composés selon la formule (2)- à titre d'activateurs des lymphocytes Ty982 des primates, notamment à titre d'activateur de la prolifération et/ou de l'activité cytotoxique et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) des lymphocytes Ty982 des primates à récepteurs TCR comprenant les régions variables V $\gamma$ 9 et V $\delta$ 2.

20 L'invention s'étend aussi aux applications des composés selon l'invention pour le traitement de cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates, dans un milieu naturel ou artificiel pouvant contenir des lymphocytes Ty982, dans lequel lesdites cellules peuvent être mises en contact avec ces lymphocytes Ty982, et qui est compatible avec les composés selon l'invention (c'est-à-dire n'est pas susceptible d'en provoquer la dégradation au moins dans certaines conditions du traitement).

25 Par "cellule sensible aux lymphocytes Ty982", on entend toute cellule sujette à l'activité effectrice induite des lymphocytes Ty982 (mort

cellulaire (destruction cellulaire par les lymphocytes Ty982); réception de cytokine relarguée par les lymphocytes Ty982 (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ...); éventuellement prolifération cellulaire induite par les lymphocytes Ty982.

L'invention s'étend donc à un procédé d'activation des lymphocytes Ty982 -notamment à un procédé d'activation de la prolifération des lymphocytes Ty982 et/ou de l'activité cytotoxique des lymphocytes Ty982 et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) par les lymphocytes Ty982- dans lequel on met ces lymphocytes Ty982 au contact d'au moins un composé selon l'invention dans un milieu contenant des lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T. Avantageusement et selon l'invention, on introduit dans le milieu une proportion d'interleukine -notamment d'interleukine 2 (IL2)- adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu. En effet, la présence du facteur de croissance lymphocytaire IL2 est indispensable pour obtenir la prolifération des lymphocytes T parmi lesquels seuls les lymphocytes Ty982 ont été activés par un composé selon l'invention. Ainsi, ce facteur de croissance doit être présent dans le milieu pour les applications où l'on recherche une prolifération des lymphocytes Ty982. Ce facteur de croissance lymphocytaire peut préexister à l'état naturel, ou être induit ou introduit dans le milieu, simultanément ou non à l'incorporation du composé selon l'invention, dans la même composition thérapeutique ou non. Néanmoins, pour certaines applications où une activation sans prolifération des lymphocytes Ty982 est recherchée (par exemple la cytotoxicité induite), la présence de ce facteur de croissance n'est pas utile.

Plus particulièrement, l'invention s'étend aux applications des composés selon l'invention à titre thérapeutique pour le traitement curatif ou préventif des pathologies produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates dans un milieu pouvant contenir ces lymphocytes Ty982 et dans lequel ces cellules peuvent être mises au contact des lymphocytes Ty982.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise au moins un composé selon l'invention à une concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération polyclonale des lymphocytes Ty982. Ce milieu peut

être choisi parmi le sang humain, le sang d'un primate non humain, les extraits de sang humain, et les extraits de sang d'un primate non humain.

Ledit milieu peut être extracorporel, ledit procédé d'activation selon l'invention étant alors un traitement cellulaire extracorporel, pouvant notamment servir en laboratoire, par exemple pour l'étude des lymphocytes Ty982 ou de leurs propriétés, ou à des fins de diagnostic. L'invention s'étend aussi à une composition pour le diagnostic extracorporel (*ex vivo*) caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé selon l'invention.

Ledit milieu peut être aussi intracorporel, l'activation des lymphocytes Ty982 ayant alors une utilité thérapeutique.

Plus particulièrement, ledit milieu est le sang périphérique d'un primate. L'invention s'étend donc en particulier à un procédé d'activation des lymphocytes Ty982 du sang périphérique d'un primate -notamment de l'homme- dans lequel on administre une quantité apte à activer les lymphocytes Ty982 d'au moins un composé selon l'invention. On administre donc au moins un composé selon l'invention par voie générale -notamment parentérale dans le sang périphérique-.

Ledit milieu peut aussi être un site cellulaire à traiter, et on administre au moins un composé selon l'invention directement au contact du site cellulaire à traiter (administration topique).

L'invention s'étend ainsi en particulier aux applications thérapeutiques des composés selon l'invention pour le traitement des pathologies des primates appartenant au groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, notamment mycobactériennes (lèpre, tuberculose...) ; des parasitoses (paludisme...) ; des pathologies à syndrome d'immunodéficience (SIDA, ...). Selon l'invention, on administre une composition thérapeutique adaptée pour libérer dans le sang périphérique et/ou sur un site cellulaire à traiter une quantité d'au moins un composé selon l'invention apte à activer les lymphocytes Ty982. En effet, il a été démontré de façon générale dans l'art antérieur sus-cité qu'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty982 peut être avantageusement utilisée pour le traitement de ces pathologies.

De façon traditionnelle, dans tout le texte, les termes "thérapie" ou "thérapeutique" englobent non seulement les traitements curatifs ou les soins, mais également les traitements préventifs (prophylaxie) tels que la vaccination ainsi que le diagnostic intracorporel (administration à des fins de  
5 diagnostic). En effet, en permettant l'activation des lymphocytes Ty982, l'invention permet des traitements d'immunostimulation pouvant être avantageux aussi bien à titre prophylactique en empêchant le développement de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty982, qu'à titre curatif en induisant la destruction de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty982.

10 L'invention s'étend ainsi à une composition thérapeutique comprenant au moins un composé selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention concerne une composition thérapeutique comprenant une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique d'au moins un composé selon l'invention -notamment pour le  
15 traitement préventif ou curatif des pathologies sus-citées-. Une composition selon l'invention peut être une composition immunostimulante, ou un vaccin, les composés selon l'invention étant des antigènes activant les lymphocytes Ty982.

Avantageusement et selon l'invention, la composition thérapeutique est caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une proportion  
20 d'interleukine -notamment d'interleukine 2- adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu où elle est destinée à être administrée.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être préparée sous une forme galénique apte à être administrée par voie générale, notamment par voie parentérale directement dans le sang périphérique d'un  
25 primate, avec au moins un composé selon l'invention en quantité adaptée pour activer les lymphocytes Ty982 et un ou plusieurs excipient(s) approprié(s). Compte tenu de la très faible valeur de la concentration active des composés selon l'invention (de l'ordre de 0,1 à 10 nM), une telle administration est envisageable sans risque de toxicité.

30 Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi être préparée sous une forme galénique appropriée pour son administration topique, directement au contact des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982.

La forme galénique d'une composition thérapeutique selon l'invention est réalisée selon la voie d'administration choisie, par les techniques traditionnelles de formulation galénique. La quantité et la concentration de composé(s) selon l'invention, et la posologie sont déterminées par référence aux traitements chimiothérapeutiques connus des maladies à traiter, compte tenu de la bioactivité des composés selon l'invention vis-à-vis des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, de l'individu à traiter, de la maladie concernée et des effets biologiques recherchés.

Avantageusement et selon l'invention, pour un composé bioactif à une concentration comprise entre 1nM et 10nM, on administre par voie générale une quantité de composé(s) selon l'invention comprise entre 0,1 $\mu$ g et 100 $\mu$ g –notamment entre 1 $\mu$ g et 10 $\mu$ g- par kilogramme de poids du patient.

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que les composés selon l'invention ne présentent aucune toxicité générale même pour des concentrations pouvant aller jusqu'à 100 $\mu$ M, soit de l'ordre de 10<sup>5</sup> fois la concentration bioactive. En outre, on sait que la catégorie biochimique de molécules à laquelle les composés selon l'invention appartiennent (phosphoesters) constitue une famille de composés métabolites rencontrés dans toute cellule vivante. Les composés selon l'invention ne présentent donc pas d'autres effets toxiques que ceux induits par leur bioactivité sur les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2.

En outre, certains composés selon l'invention présentent un poids moléculaire suffisamment faible (notamment inférieur à 500) pour être compatible avec leur élimination par voie rénale et urinaire.

Un exemple de formulation de composition thérapeutique injectable selon l'invention pour un primate de 1kg est le suivant : 5 $\mu$ g de 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (IHPP) dilués dans 0,5ml de tampon phosphate stérile à pH 7 amenés à 37°C.

On administre ainsi 5 $\mu$ g d'IHPP (composé de formule (2)) pour 1kg d'animal, correspondant à une concentration dans le sang circulant adaptée pour être supérieure à la concentration bioactive de l'IHPP (une concentration de 10nM d'IHPP correspondant à environ 5ng/ml).

Il est à noter que la majorité des excipients ou autres additifs pharmaceutiquement acceptables traditionnellement utilisés, sont chimiquement compatibles avec les composés selon l'invention.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi  
5 avantageusement comprendre un ou plusieurs autre(s) principe(s) actif(s), notamment pour procurer un effet synergique. En particulier, un composé selon l'invention peut faire office d'adjuvant de vaccin. La composition thérapeutique vaccinnante selon l'invention est alors formée d'une composition vaccinnante connue à laquelle on rajoute une quantité de composé(s) selon l'invention apte à  
10 activer les lymphocytes Ty982 qui non seulement pourront exercer directement leur activité anti-infectieuse, mais aussi activer les lymphocytes T effecteurs de la réponse vaccinnale traditionnelle.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi incorporer elle-même des lymphocytes Ty982 de primates en culture dans un  
15 milieu compatible avec la croissance lymphocytaire T. Elle peut alors servir au traitement des primates, ou plus généralement des animaux vertébrés avec lesquels l'administration des lymphocytes Ty982 de primates peut être effectuée dans des conditions de compatibilité immunitaire vis-à-vis desdits lymphocytes Ty982 de primates. Une telle composition selon l'invention peut être administrée  
20 par voie générale, ou même par voie topique, au contact des cellules cibles pathogènes, sensibles auxdits lymphocytes Ty982 de primates.

L'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'au  
25 moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates -notamment une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses et des  
30 pathologies à syndrome d'immunodéficience-. A ce titre, l'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du

sang périphérique ou par voie topique- à un primate -notamment à l'homme- pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionnée ci-dessus.

L'invention s'étend aussi à un procédé de fabrication d'une composition -notamment une composition thérapeutique- selon l'invention ayant  
5 la propriété d'activer les lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

L'invention porte aussi sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules pathogènes  
10 sensibles aux lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 de primates, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention. L'invention porte en particulier sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules  
15 sensibles aux lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 -notamment une pathologie appartenant au groupe mentionné ci-dessus-, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, dans un procédé de fabrication selon l'invention, on met au moins un composé selon l'invention au  
20 contact d'un milieu contenant des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 de primates, et compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer ces lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 dans ce milieu. Avantageusement et selon l'invention, ledit milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates. On obtient alors une composition thérapeutique contenant  
25 des lymphocytes T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 activés, permettant de réaliser une approche thérapeutique cellulaire.

Il est à noter que les composés selon l'invention sont halogénés et ne peuvent donc pas, pour cette seule raison, correspondre aux phosphoantigènes naturels, notamment aux molécules dites Tubag1, Tubag2,  
30 Tubag3 et Tubag4 obtenues comme décrit par WO 95/20673. Au demeurant, on démontre par exemple que ces phosphoantigènes naturels sont dégradés par l'eau de brome servant à la fabrication chimique des phosphobromohydrines selon

l'invention. Les composés selon l'invention ne sont donc pas des antigènes naturels, mais sont des antigènes synthétiques activateurs des lymphocytes T $\gamma$ 982 à des concentrations du même ordre, et avec une efficacité semblable voire même supérieure à celle des antigènes naturels.

5 Il est aussi à noter que, contrairement à l'état de la technique tel qu'illustré par US-5639653 qui considérait que la présence d'un groupe alkyle ou alcène était indispensable pour activer les lymphocytes T $\gamma$ 982 humains, les inventeurs ont constaté qu'en détruisant la liaison alcène avec addition d'halogène, élément absent des composés biologiques naturels, une  
10 activation des lymphocytes T $\gamma$ 982 extrêmement forte et à très faible concentration est obtenue. En particulier, on constate que l'effet peut même dépasser celui des phosphoantigènes d'origine naturelle.

D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention apparaissent à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs  
15 uniquement à des fins de compréhension, ainsi que des figures dans lesquelles :

- la figure 1 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 10,
- la figure 2 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 11.

20 EXEMPLE 1 : Fabrication du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (BrHPP) :

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate (isopentényl tosylate) :

Dans un réacteur en verre équipé pour la manipulation sous atmosphère inerte et soigneusement séché, sont introduits sous agitation  
25 magnétique (2,32 mmoles - 442mg) de chlorure de tosyle et (2,55 mmoles - 312 mg) de 4-(N,N-diméthylamino)pyridine dans 5 ml de dichlorométhane anhydre. A ce mélange, on ajoute lentement à l'aide d'une seringue et par l'intermédiaire d'un septum (2,32 mmoles - 200 mg) d'isopenténol en solution dans environ 1ml de dichlorométhane. La réaction est suivie par chromatographie sur couche  
30 mince de silice (gel de silice 60 F-254 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15 v/v -  $R_f$  (produit) = 0,4 et  $R_f$  (TsCl) = 0,5). Après environ 3 heures d'agitation sous atmosphère d'azote on dilue le mélange réactionnel dans un grand volume



d'hexane (environ 100ml) ce qui entraîne la formation immédiate d'un précipité blanc. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat concentré par évaporation sous pression réduite. La solution est diluée avec du diéthyl éther et filtrée à nouveau. Après évaporation du solvant, on obtient une huile jaunâtre. Le produit est purifié  
5 par chromatographie sur colonne préparatrice de silice (gel de silice 60 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15). (1,98 mmoles - 475 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (85 % en rendement isolé) sont ainsi obtenus. Le composé (huile incolore) est stocké à + 4°C en milieu anhydre.

Préparation du tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate :  
10 (4,5 mmoles - 1g) de sel de disodium-dihydrogènapyrophosphate ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniaque 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme  $\text{H}^+$ ). La solution acide est éluée avec  
15 15-20 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement titrée à pH 7,3 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium ( $\text{Bu}_4\text{NOH}$ ) à 40% . Après lyophilisation on obtient 4 g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis  
20 séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient ainsi une solution de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate avec une pureté égale à 98 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

25 Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl - diphosphate (isopentényl pyrophosphate) :

Dans un réacteur en verre soigneusement séché, on introduit sous atmosphère d'azote 2,5 ml d'une solution de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate à 0,7 M (1,75 mmoles) dans  
30 l'acétonitrile anhydre. Le réacteur est refroidi par un bain de glace puis on ajoute sous agitation magnétique et à l'aide d'une seringue (0,70 mmoles - 168 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate en solution dans un minimum d'acétonitrile (0,5

- 1M). Après introduction du tosylate, le bain de glace est retiré puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est alors suivi par chromatographie ionique (HPAEC). Après environ 3 heures, le solvant est évaporé sous pression réduite et le milieu réactionnel redissout dans 3 ml d'un mélange eau /2-propanol 98/2 (v/v). La solution est passée sur une  
5 colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme  $\text{NH}_4^+$ ) puis éluée avec 10 ml du mélange eau (pH 9)/2-propanol 98/2 (v/v). Après lyophilisation, on recueille un solide blanc contenant le produit brut.

10 Purification :

Le pyrophosphate et les traces de monophosphate d'ammonium sont séparés du milieu par co-précipitation en présence d'hydrogénocarbonate d'ammonium. On dissout le produit brut obtenu à l'étape précédente dans 4 ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M que l'on  
15 transfère dans un tube à centrifugation de 25 ml. On traite alors la solution avec 10 ml d'un mélange acétonitrile/2-propanol 1/1 (v/v) en agitant vigoureusement le mélange (vortex) pendant quelques minutes jusqu'à formation d'un précipité blanc. Le tube est ensuite centrifugé à 2000 tr/min à 10 °C pendant 5 minutes. Le surnageant, dans lequel sont extraits les sels organiques, est conservé à +4°C. La  
20 procédure est renouvelée en redissolvant le précipité dans 3ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M auxquels on ajoute 7 ml du mélange acétonitrile/2-propanol. Les deux surnageants sont regroupés et le solvant évaporé sous vide. On obtient un liquide huileux que l'on conserve à +4°C.

Le tosylate d'ammonium est séparé du milieu réactionnel  
25 par extraction avec le solvant chloroforme/méthanol 1/1 (v/v). Le liquide huileux de l'étape précédente est dissout dans 4 ml d'eau à pH 9 et traité avec 1ml de ce solvant par une procédure classique d'extraction répétée 3 fois. On élimine ensuite de la phase aqueuse les traces de solvant par évaporation sous pression réduite à 30 °C. On obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique  
30 (HPAEC) un rendement de 83 % en 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (0,58 mmoles - 172 mg). La solution est stockée à -20 °C.

Le produit est purifié ultérieurement selon les besoins par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak Accell Plus QMA (Waters®) de 360 mg à 10 grammes éluées successivement par des solutions aqueuses d'hydrogénocarbonate d'ammonium respectivement de 20 mM, 40 mM, 100 mM, puis 200 mM avec suivi chromatographique (HPAEC) des fractions élues. Les fractions correspondant au produit purifié sont regroupées puis lyophilisées.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate :

(0,34 mmoles - 100 mg) d'isopentényl pyrophosphate (sel d'ammonium) en solution dans 2 ml d'eau déionisée de pH neutre sont traitées sous une hotte aspirante et à température ambiante par 1,9 ml (0,34 mmoles) de brome en solution aqueuse saturée (0,18 M). L'eau de brome est ajoutée progressivement et de préférence sur une solution froide du sel d'ammonium en agitant périodiquement jusqu'à décoloration de l'eau de brome. Dans le cas où le brome est ajouté en léger excès (coloration jaune persistante), la solution est transférée dans un ballon en verre puis placée quelques minutes sous pression réduite (évaporateur rotatif) à une température de 30 °C jusqu'à disparition de la coloration. Le produit 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate est généré quantitativement (0,33 mmoles - 130 mg) ; ce résultat étant déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC. Pour la mise en œuvre de test biologiques, les solutions aqueuses ainsi obtenues sont filtrées puis neutralisées par passage sur colonne de résine cationique. Les ions bromures peuvent être éliminés de la solution en utilisant un dispositif DIONEX® composé d'une cartouche OnGuard®-Ag fixée sur une cartouche OnGuard®-H. Ce dispositif permet de retenir sélectivement les ions halogénures de la solution. Pour la mise en œuvre de tests biologiques, les solutions aqueuses du produit sont stérilisées par filtration sur filtre de 0,2 µm et stockées (de préférence avec un pH neutre à légèrement acide) à -20 °C. Dans le cas de tests réalisés *in vivo*, les solutions sont préalablement passées sur une colonne de résine cationique DOWEX® 50-WX8-200 (forme Na<sup>+</sup>) élue par deux volumes de colonne d'eau déionisée.

EXEMPLE 2 : Fabrication du 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (IHPP) :

Préparation de l'eau iodée :

Une solution d'eau iodée de l'ordre de 0,5 à 1 mM est préparée par sonication prolongée (15 minutes environ) de quelques cristaux d'iode dans une solution d'eau déionisée et filtration. Pour des essais portant sur  
5 de plus grandes quantités, des solutions plus concentrées en iode peuvent être obtenues en rajoutant une faible proportion d'alcool à la solution aqueuse initiale. L'eau iodée est ensuite titrée par le thiosulfate de sodium avec de l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Préparation du 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate :

10 Une micromole (1 ml d'une solution millimolaire) d'isopentényl pyrophosphate préparé selon l'exemple 1 sous forme de sel d'ammonium en milieu aqueux ou hydroalcoolique de pH neutre est traitée à température ambiante par ajout d'une micromole d'iode en solution aqueuse (1,43 ml d'eau iodée à 0,7 mM). La solution est placée 30 minutes à température  
15 ambiante, puis 30 minutes à +4 °C en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate est généré quantitativement (1 micromole dans environ 2,5 ml). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en œuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à  
20 - 20°C.

EXEMPLE 3 : Fabrication du 3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate (CIHPP) :

Préparation de l'eau de chlore :

La solution d'eau de chlore est préparée par barbotage de  
25 chlore gazeux dans une solution d'eau déionisée. Elle est ensuite titrée par le thiosulfate de sodium en présence d'iodure de potassium en excès et avec de l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Préparation du 3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate :

30 Une micromole (1 ml d'une solution millimolaire) d'isopentényl pyrophosphate préparé selon l'exemple 1 sous forme de sel d'ammonium en milieu aqueux ou hydroalcoolique de pH neutre est traitée à température ambiante par ajout d'une micromole de chlore en solution aqueuse

(72 µl d'eau de chlore à 14 mM). Après 30 minutes à température ambiante avec agitation périodique, le produit 3-(chlorométhyl)-3-butanol-1-yl-diphosphate est généré quantitativement (ici 1 micromole dans environ 1,1 ml). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 4 : Fabrication du 3-(bromométhyl)-3-butanol-

1-yl-triphosphate (BrHPPP) :

Préparation du tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate :

(2,1 mmoles - 1g) de sel de pentasodium tripolyphosphate

hexahydrate ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniaque 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (21 milliéquivalents - 4,4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 (forme  $\text{H}^+$ ). La solution acide est éluée avec 20-25 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement

titrée à pH 7,0 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium ( $\text{Bu}_4\text{NOH}$ ) à 40% . Après lyophilisation on obtient 2,5 g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient

ainsi une solution de tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec une pureté égale à 95 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (isopentényl triphosphate) :

En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère d'azote 2 mmoles d'une solution molaire de tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec (1 mmole - 240 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate préparé selon l'exemple 1 dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pendant 24 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-3-butène-1-yl-diphosphate, on obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de

74% en 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (0,74 mmoles - 292 mg). Pour la préparation de composés phosphohalohydrines selon l'invention dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. On prépare de cette manière environ 2 ml d'une solution aqueuse millimolaire de pH neutre de 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate :

300 nmoles (300 µl d'une solution millimolaire) d'isopentényl triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 300 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (1,7 µl d'eau de brome à 180 mM). On observe une décoloration quasi instantanée de l'eau de brome. Après agitation du mélange et décoloration de l'eau de brome (quasi instantanée), le produit 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est généré quantitativement (300 µl d'une solution millimolaire). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 5 : Fabrication du 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate (IHPPP) :

300 nmoles (300 µl d'une solution millimolaire) d'isopentényl triphosphate préparé selon l'exemple 4 sont traitées en milieu aqueux ou hydroalcoolique de pH neutre par ajout de 429 µl d'eau iodée à 0,7 mM préparée selon l'exemple 2. La solution est laissée 30 minutes à température ambiante en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit 3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est généré quantitativement (729 µl d'une solution à 411 µM). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 6 : Fabrication du  $\alpha,\gamma$  di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate (diBrHTP) :

Préparation du  $\alpha,\gamma$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-triphosphate :

En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère

d'azote 0,5 mmoles d'une solution molaire de tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate (préparé selon l'exemple 4) avec (1 mmole - 240 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate (préparé selon l'exemple 1) dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pendant 24 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-3-butène-1-yl-diphosphate, on obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 81 % en  $\alpha,\gamma$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-triphosphate (0,4 mmoles - 178 mg). Pour la préparation de composés phosphohalohydrines selon l'invention dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque passage chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader l'isopentényl triphosphate, qui est un sous produit de la réaction. On prépare de cette manière environ 1 ml d'une solution aqueuse millimolaire de pH neutre de  $\alpha,\gamma$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du  $\alpha,\gamma$  di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate :

250 nmoles (250  $\mu$ l d'une solution millimolaire) de  $\alpha,\gamma$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 250 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (1,4  $\mu$ l d'eau de brome à 180 mM). Après agitation du mélange et décoloration de l'eau de brome (quasi instantanée), le produit  $\alpha,\gamma$  di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est généré quantitativement (environ 250  $\mu$ l d'une solution millimolaire). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 C.

EXEMPLE 7 : Fabrication du  $\alpha,\gamma$  di-[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate (diIHTP) :

250 nmoles (250  $\mu$ l d'une solution millimolaire) de  $\alpha,\gamma$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-triphosphate préparé selon l'exemple 6 sont traitées en milieu aqueux ou hydroalcoolique de pH neutre par ajout de 358  $\mu$ l d'eau iodée à 0,7 mM préparée

selon l'exemple 2. La solution est laissée 30 minutes à température ambiante en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit  $\alpha,\gamma$  di-[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est généré quantitativement (608  $\mu$ l d'une solution à 411  $\mu$ M). La solution est ensuite traitée  
5 comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.

EXEMPLE 8 : Fabrication de l'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] :

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-méthyl-3-butène-1-yl] :

10 Ce produit est préparé selon la procédure décrite par KNORRE D. C. *et al.* "General Method for the synthesis of ATP Gamma-derivatives" Febs Letters, 1976, 70-1, 105-108, à partir de 40  $\mu$ moles d'uridine-5'-triphosphate (UTP) (sel de triéthylammonium) en présence d'un excès d'isopenténol. Pour la préparation de composés phosphohalohydrines selon  
15 l'invention dans le cadre de tests biologiques, une fraction du produit obtenu est purifié par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque passage chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader les sous produits  
20 (UDP et UMP) et l'UTP n'ayant pas réagi. On prépare de cette manière environ 500 $\mu$ l d'une solution aqueuse à 300  $\mu$ M de pH neutre de l'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-méthyl-3-butène-1-yl] sous forme de sel d'ammonium.

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl]:

75 nmoles (250  $\mu$ l d'une solution 300  $\mu$ M) d'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-méthyl-3-  
25 butène-1-yl] sous forme de sel d'ammonium sont traitées en milieu aqueux de pH neutre par ajout de 108  $\mu$ l d'eau iodée à 0,7 mM préparée selon l'exemple 2. La solution est laissée 20 minutes à température ambiante en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit de l'uridine 5'-triphosphate  $\gamma$ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] est généré quantitativement (environ  
30 360  $\mu$ l d'une solution à 200  $\mu$ M). La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 1 pour la mise en oeuvre de tests biologiques et/ou pour la réalisation d'essais *in vivo* et stockée à -20 °C.



EXEMPLE 9 : Fabrication du  $\alpha,\beta$  di-[3-bromométhyl-3-butanol-1-yl]-diphosphate :

Ce produit est préparé selon une procédure analogue à celle décrite dans l'exemple 6, le tetrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogénotriphosphate étant remplacé par le  
5 tris(tétra-n-butylammonium) hydrogénopyrophosphate (préparé selon l'exemple 1) pour la préparation du composé intermédiaire :  $\alpha,\beta$  di-[3-méthyl-3-butène-1-yl]-diphosphate.

EXEMPLE 10 : Mesure de l'activité antigénique par stimulation de la prolifération des lymphocytes Ty982 en culture :

10 Dans une culture in vitro de  $10^6$  lymphocytes T totaux dans 1ml, séparés à partir du sang d'un donneur humain sain adulte et contenant initialement de 1-5% de lymphocytes Ty982 en milieu de culture adéquat (RPMI 1640+10% de sérum humain inactivé et 50 U/ml d'interleukine 2 humaine (hIL-2), on rajoute 20 microlitres de solution aqueuse du composé selon l'invention  
15 amené à la concentration finale spécifiée dans l'essai. Après 4 jours de culture, on rajoute par millilitre de milieu de culture 50 U d'hIL-2. Après huit jours les cellules sont énumérées, collectées, lavées par un tampon phosphate, et les cellules de type Ty982 sont révélées dans la culture par un marquage avec les réactifs commerciaux usuels (Anticorps monoclonaux fluorescéinés) et leur  
20 proportion déterminée par une analyse de cytométrie en flux. On prend en compte soit le changement de la proportion, soit l'augmentation numérique des cellules Ty982 dans des cultures en présence du composé selon l'invention par rapport à des cultures exemptes de composé selon l'invention. On représente le résultat de ces essais en traçant les courbes de ces valeurs (ordonnées figure 1) en  
25 fonction de la concentration en échelle logarithmique de composé selon l'invention mis en culture (abscisses figure 1).

La figure 1 représente les résultats obtenus avec les composés selon l'invention obtenus aux exemples 1 (BrHPP) et 2 (IHPP), la ligne en pointillés représentant un contrôle négatif (valeur obtenue en l'absence  
30 de composé selon l'invention).

Le tableau I suivant illustre les valeurs de DE50, dose efficace à 50 % de l'effet maximal d'amplification lymphocytaire polyclonale obtenu comme indiqué ci-dessus, avec différents composés selon l'invention.

Tableau I

MOLECULE			DE 50% nM
Nom	Abréviation	Structure	
isopentényl pyrophosphate	IPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \parallel \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \end{array}$	3000
3-(chlorométhyl)- 3-butanol-1-yl- diphosphate	CHPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ Cl} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	100
3-(bromométhyl)- 3-butanol-1-yl- diphosphate	BrHPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ Br} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	10
3-(iodométhyl)-3- butanol-1-yl- diphosphate	IHPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ I} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	3
3-(bromométhyl)- 3-butanol-1-yl- triphosphate	BrHPPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ Br} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	120
3-(iodométhyl)-3- butanol-1-yl- triphosphate	IHPPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ I} \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	70
$\alpha$ , $\gamma$ di-3- (bromométhyl)-3- butanol-1-yl- triphosphate	di-BrHTP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ Br} \qquad \qquad \text{CH}_2 \text{ Br} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} - \text{CH}_3 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$	3000
$\alpha$ , $\gamma$ di-3- (iodométhyl)-3- butanol-1-yl- triphosphate	di-IHTP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{ I} \qquad \qquad \text{CH}_2 \text{ I} \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} - \text{CH}_3 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$	7000

EXEMPLE 11 : Mesure de l'activité antigénique par stimulation de la cytotoxicité induite :

On compare l'activité cytotoxique spécifique d'un clone de lymphocyte Ty982 mesurée selon le test de cytotoxicité induite, cette activité  
5 étant simulée avec des concentrations décroissantes du phosphoantigène Tubag3 obtenu comme décrit par WO 95/20673 (courbe représentée par des losanges noirs figure 2), du composé BrHPP selon l'invention obtenu à l'exemple 1 (courbe représentée par des carrés noirs figure 2), du composé IHPP selon l'invention obtenu à l'exemple 2 (courbe représentée par des ronds blancs figure  
10 2), et de l'isopentényl pyrophosphate IPP (courbe représentée par des triangles noirs figure 2).

On constate que les composés selon l'invention sont actifs à une concentration de l'ordre de 10 nM du même ordre que celle du phosphoantigène naturel Tubag3, alors que l'IPP de l'art antérieur est actif à une  
15 concentration de l'ordre de 3  $\mu$ M, soit 300 fois plus élevée.

EXEMPLE 12 : Toxicité de BrHPP (sel de sodium):

Huit souris de 30g ont reçu une injection intraveineuse (veine caudale) de 300  $\mu$ l de tampon PBS contenant 1 mg de BrHPP (sel de sodium). On n'observe aucun signe de choc ou de pyrogénicité : 8 souris sont survivantes à 30 jours; aucune variation  
20 significative du poids des souris n'est notée au cours de l'étude. La toxicité est donc inférieure à 12,5 % pour une dose de 33,4 g de BrHPP ( $\text{Na}^+$ ) par kilogramme d'animal.

EXEMPLE 13 : Pyrogénicité de BrHPP (sel de sodium):

Cet essai est réalisé selon un protocole défini par les normes ISO-10993-11.(1993) et  
25 USP XXIII. Il s'agit de l'évaluation de la réaction fébrile chez le lapin, après administration intraveineuse du BrHPP (sel de sodium) à 400  $\mu$ g/ml (soit 10 ml d'extrait par kilogramme) à trois lapins. La température est mesurée toutes les 30 minutes durant 3 heures débutant 30 minutes après l'injection.

Un seul lapin a présenté une augmentation de température supérieure à 0.5°C (seuil  
30 minimum). A l'injection de la solution à 400  $\mu$ g/ml, les lapins ont présenté un effet secondaire se traduisant par des tremblements musculaires. Un autre lapin injecté avec

la même solution diluée 1:40 soit donc à 10 µg/ml en 19 minutes n'a présenté aucune réaction à l'injection.

**EXEMPLE 14 : Bioactivité de BrHPP (sel de sodium) *in vivo***

chez le macaque :

- 5 Ces essais sont réalisés sur des singes *Macaca fascicularis* (males de 3 à 4 kg) sous anesthésie par Zoletil (zolazepam)® 15 mg/kg -Atropine 0.01mg/kg. Les lots de BrHPP (forme Na<sup>+</sup>) sont préalablement contrôlés en pureté (>99%), quantifiés et ont été évalués par les tests de pyrogénicité de l'exemple 12. Les animaux sont injectés par intraveineuse rapide (2 à 5 minutes dans la veine saphène) avec 0.1 mg/kg de
- 10 BrHPP (soit 0,3-0,4 mg par animal) et dilués dans 10 ml de Ringer-Lactate. On injecte également 90.000 unités d'interleukine 2 (IL2) par animal en sous-cutané. On procède à ces injections une fois par jour pendant quatre jours. Des animaux de contrôle ne reçoivent que l'injection sous-cutanée d'IL2 une fois par jour durant quatre jours.
- On compare entre les divers animaux la proportion de lymphocytes Ty982 parmi les
- 15 lymphocytes totaux , dans les trois situations suivantes :
- dans le sang de l'animal,
  - dans une culture de lymphocytes totaux prélevés de l'animal avec BrHPP seul,
  - dans une culture de lymphocytes totaux prélevés de l'animal avec BrHPP +IL2.

Les résultats sont donnés dans le tableau II suivant :

20

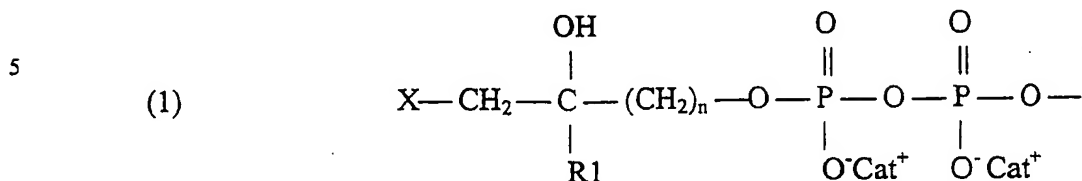
Tableau II

animaux injectés:	% de lymphocytes Ty982 sanguins <i>in vivo</i> ( 7 jours après injection)	réactivité <i>ex vivo</i> des lymphocytes Ty982 (% après 10j de culture <i>in vitro</i> )	
		amplification par 40 nM BrHPP	amplification par 40 nM BrHPP+IL2
Naifs ou IL2 seule	~1%* [0.8-1.4]	1%	~ 8% [4.7-12]
BrHPP seul	~1%	1%	~ 11% [10-12]
2 fois BrHPP seul (1 injection + 1 rappel)	~1%	1%	40.2%
BrHPP + IL2	7 % [5-10]	10%	50.0 %

On constate que l'injection intraveineuse unique ou répétée de BrHPP seul préactive les lymphocytes Ty9δ2 du singe mais ne stimule pas leur croissance chez l'animal. L'injection du BrHPP seul provoque l'état de préactivation des lymphocytes Ty9δ2, 5 qui se manifeste notamment par l'expression des récepteurs du facteur de croissance IL2 à leur surface cellulaire. Par contre, l'injection intraveineuse de BrHPP en présence d'IL2 sous-cutanée préactive ces mêmes cellules et provoque leur croissance *in vivo*. L'injection du facteur de croissance IL2 seul ne provoque pas de réponse spécifique des lymphocytes Ty9δ2.

## REVENDICATIONS

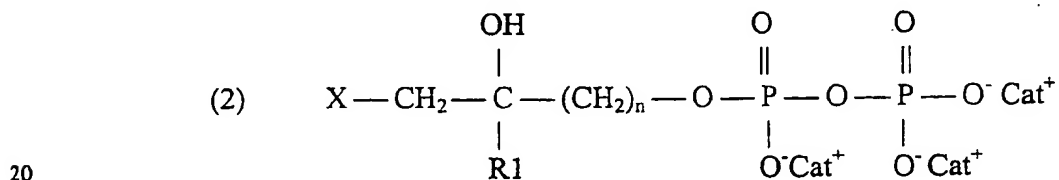
1/ - Composés comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :



où X est un halogène choisi parmi I, Br, Cl,  
R1 est choisi parmi  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  
Cat<sup>+</sup> est un cation organique ou minéral,  
et n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

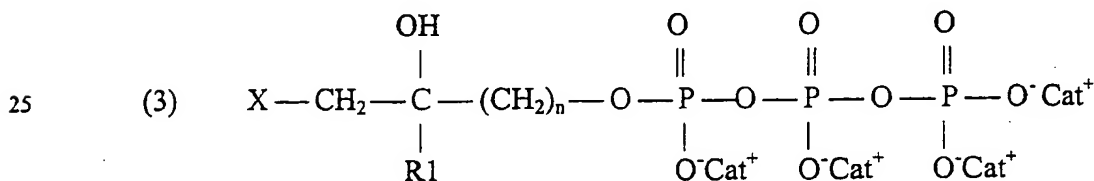
2/ - Composés phosphohalohydrines selon la revendication

1, de formule :



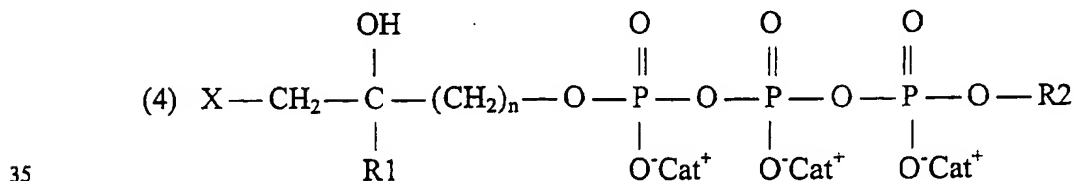
3/ - Composés phosphohalohydrines selon la revendication

1, de formule :

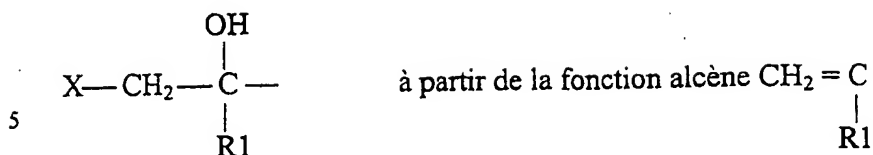


4/ - Composés phosphohalohydrines selon la revendication

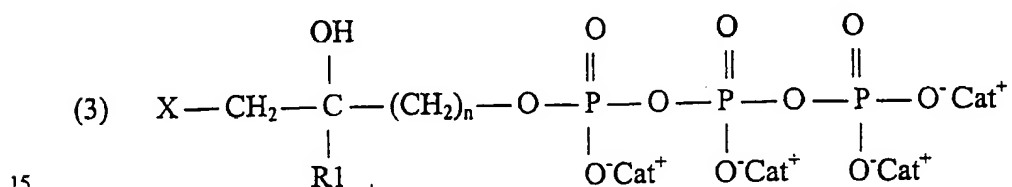
1, de formule :



où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine



et de l'halogène  $\text{X}_2$  en présence d'eau ; et des substituants pour lesquels il existe un composé  $\text{R}_2\text{-O-Y}$  non réactif sur la fonction halohydrine du composé de  
10 formule :



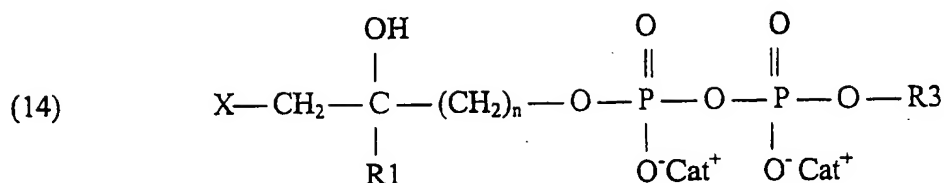
et choisi pour que  $\text{R}_2\text{-O-Y}$  puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé (3) pour obtenir le composé (4).

5/ - Composés selon l'une des revendications 1 et 4,  
20 comprenant en outre au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides  
25 phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des époxydes et des halohydrines.

6/ - Composés selon les revendications 4 et 5, dans lesquels  $\text{R}_2$  est choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des  
30 peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des phosphohalohydrines selon la formule (1), des aldéhydes, des époxydes et des  
35 halohydrines.

7/ - Composés phosphohalohydrines selon la revendication

1, de formule:



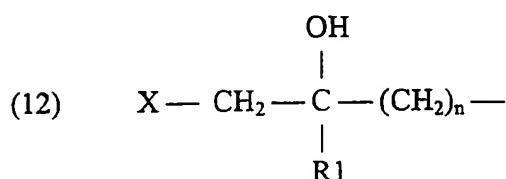
où X est un halogène choisi parmi l'iode, le brome et le chlore,

R1 est choisi parmi  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,

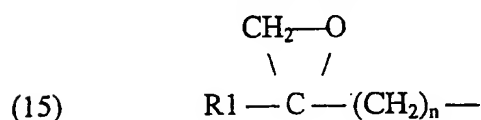
Cat<sup>+</sup> représente un (ou des) cation(s) organique(s) ou minéral(aux) (y compris le proton) identiques ou différents dans le même composé,  
n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

R3- est choisi parmi :

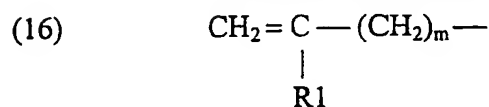
- un groupement halohydrine de formule :



- un groupement époxyde de formule :



- un groupement alcène de formule :



m étant un nombre entier compris entre 1 et 20.

8/ Composés selon l'une des revendications 1 à 7 pour leur utilisation comme agent activateur des lymphocytes Tγ9δ2.

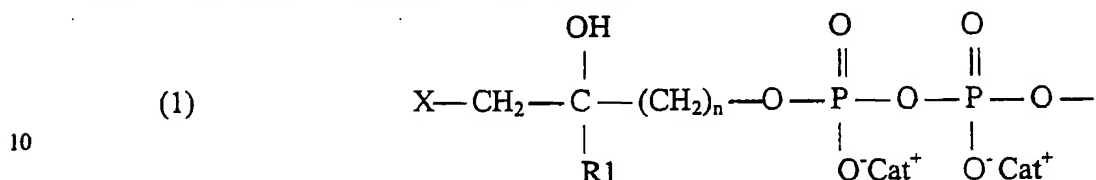
9/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 8 pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

10/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 9 pour leur utilisation dans une composition thérapeutique immunostimulante ou un vaccin pour les primates.



11/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 10 pour leur utilisation à titre d'antigènes des lymphocytes Tγ9δ2 dans une composition thérapeutique -notamment une composition immunostimulante ou un vaccin- pour les primates.

5 12/ - Procédé de fabrication d'un composé comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :



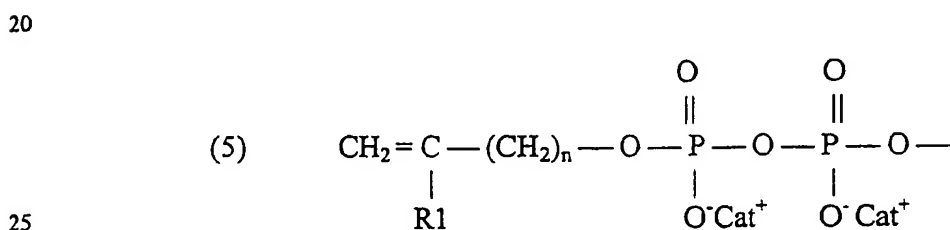
où X est un halogène choisi parmi I, Br, Cl,

R1 est choisi parmi  $-\text{CH}_3$  et  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,

15  $\text{Cat}^+$  est un cation organique ou minéral,

et n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

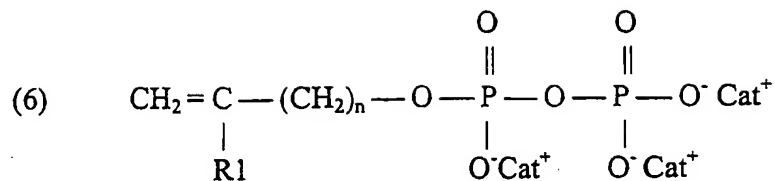
caractérisé en ce qu'on fait réagir l'halogène  $\text{X}_2$  en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de formule :



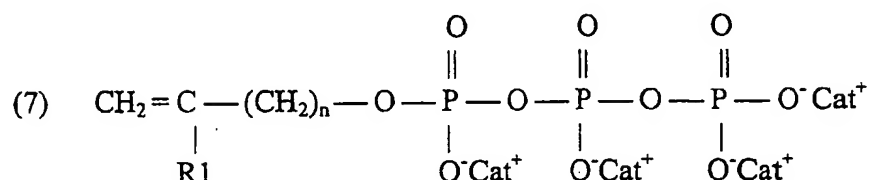
13/ - Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on fait réagir en milieu aqueux ou hydroalcoolique, à pH neutre, à une température inférieure à 30°C, une solution aqueuse de l'halogène  $\text{X}_2$  avec un sel  
30 formé du composé de départ.

14/ - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on effectue la réaction sous pression atmosphérique à une température comprise entre 0°C et 25°C.

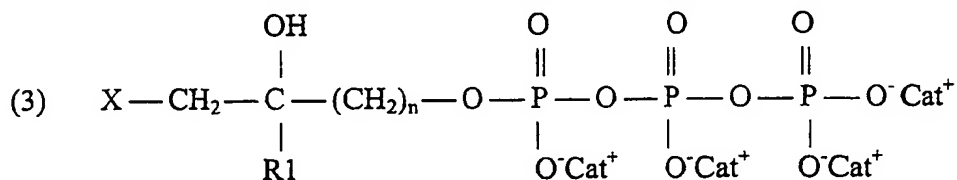
15/ - Procédé selon l'une des revendications 12 à 14,  
35 caractérisé en ce que le composé de départ est un sel de formule :



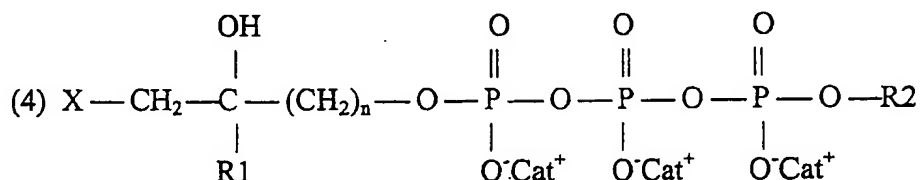
16/ - Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que le composé de départ est un sel de formule :



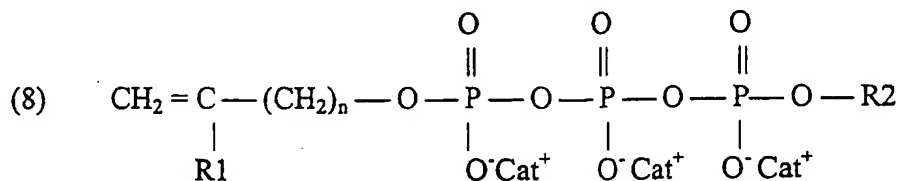
17/ - Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que dans une étape ultérieure, on fait réagir le composé obtenu :



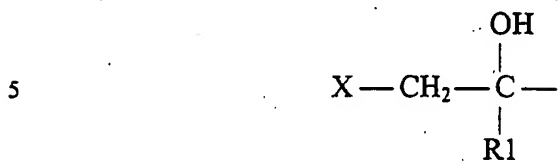
avec un composé R2-O-Y, où -O-Y est un groupement partant, et R2 est un substituant organique ou minéral choisi pour que R2-O-Y puisse former, par réaction sur le composé (3), le composé de formule :



18/ - Procédé selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que le composé de départ est un sel de formule :



où R2 est un substituant organique ou minéral adapté pour ne pas empêcher la formation de la fonction halohydrine



à partir de la fonction alcène  $\text{CH}_2 = \text{C}$  et de l'halogène  $\text{X}_2$  en présence d'eau.



19/ - Composition pour le diagnostic extracorporel, caractérisée en qu'elle comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

20/ - Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

21/ - Composition thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- d'au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

22/ - Composition selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre des lymphocytes Ty9δ2 de primates.

23/ - Composition selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une proportion d'interleukine adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu où elle est destinée à être administrée.

24/ - Procédé de fabrication d'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty9δ2, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

25/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty9δ2, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

26/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement

préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

27/ - Procédé de fabrication d'une composition  
5 thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses, et des pathologies à syndrome d'immunodéficience, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

10 28/ - Procédé selon l'une des revendications 24 à 27, dans lequel on met au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7 au contact d'un milieu contenant des lymphocytes Ty982, et compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer ces lymphocytes Ty982 dans ce milieu.

15 29/ - Procédé selon la revendication 28, dans lequel ledit milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates.

30/ - Procédé d'activation extracorporelle des lymphocytes Ty982 de primates, dans lequel on met les lymphocytes Ty982 au contact d'  
20 moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7, dans un milieu extracorporel contenant les lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T.

31/ - Procédé selon la revendications 30, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7 à une  
25 concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération polyclonale des lymphocytes Ty982.

32/ - Procédé selon l'une des revendications 30 à 31, dans lequel on introduit dans le milieu une proportion d'interleukine adaptée pour engendrer une croissance lymphocytaire dans le milieu.

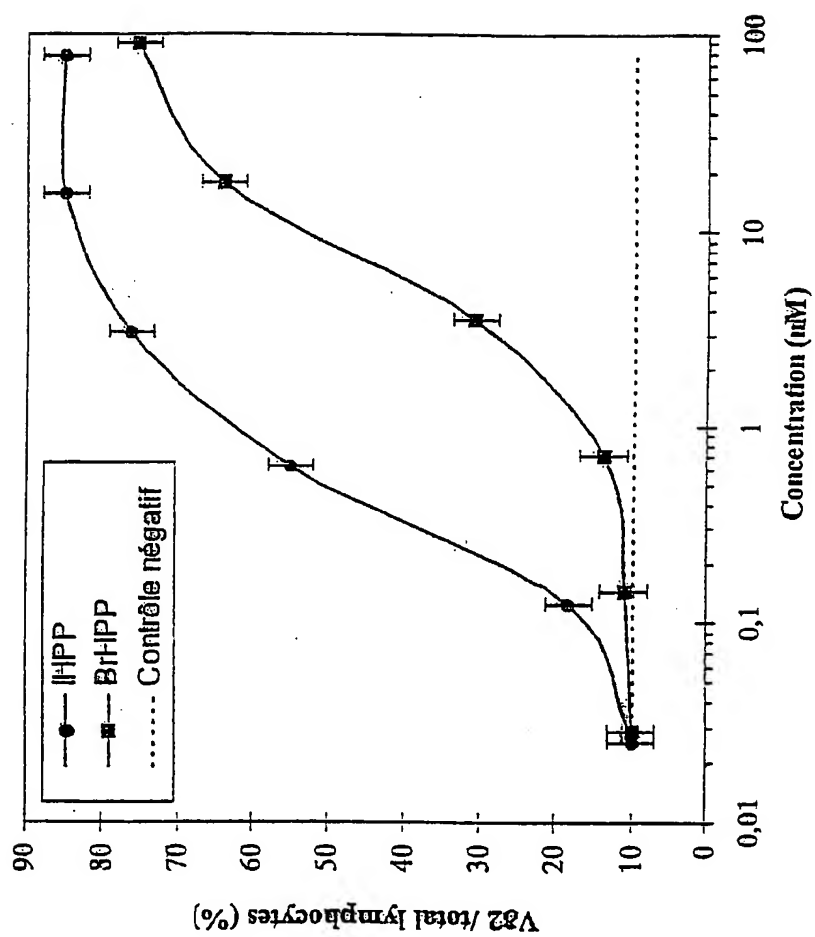


Fig. 1

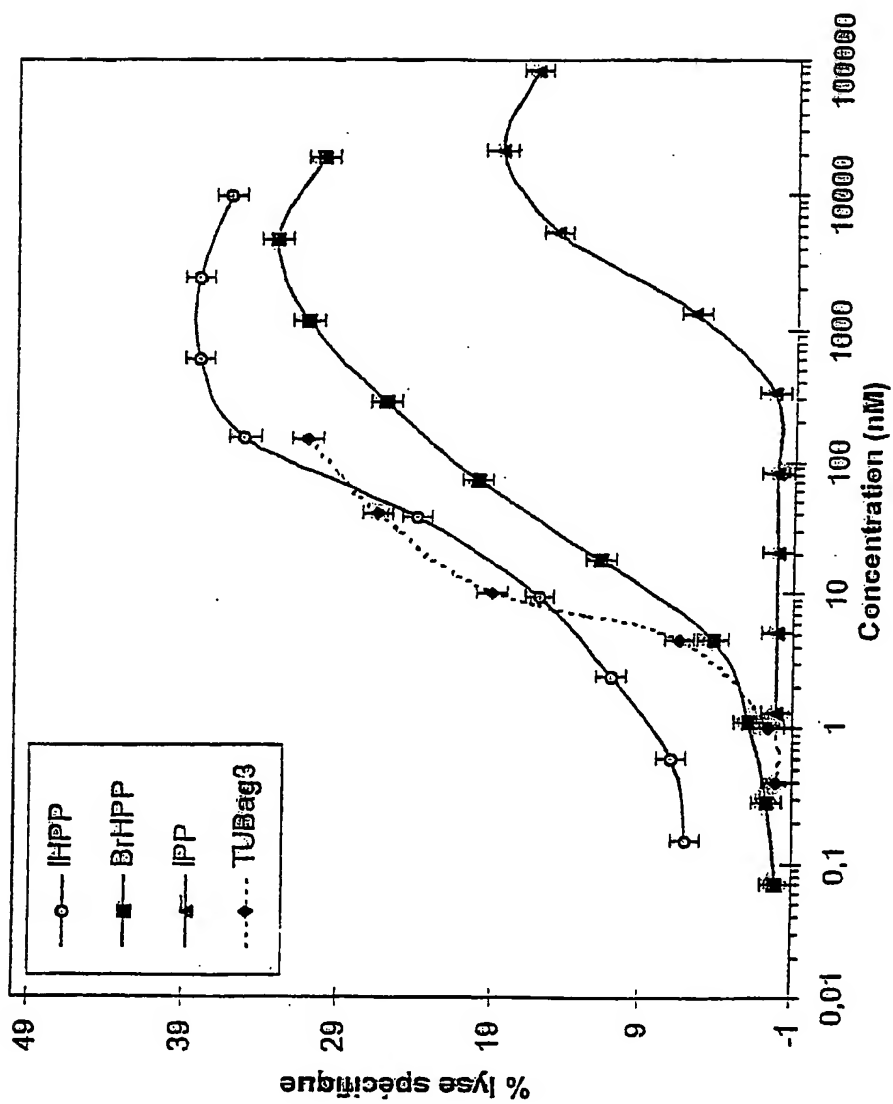


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No  
PCT/FR 99/02058

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07F9/09 C07H19/10 C12N5/06 A61K31/66 A61K49/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07F C07H C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 20673 A (C.N.R.S.) 3 August 1995 (1995-08-03) cited in the application the whole document	1-32
A	US 5 639 653 A (BARRY R. BLOOM) 17 June 1997 (1997-06-17) cited in the application the whole document	1-32
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 December 1999		Date of mailing of the international search report  11/01/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Beslier, L

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ternational Application No  
PCT/FR 99/02058

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANAKA Y ET AL: "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human.gamma..delta. T cells" NATURE (LONDON) (NATUAS,00280836);1995; VOL.375 (6527); PP.155-8, XP002102418 Albert Einstein College Medicine;Howard Hughes Medical Inst.; Bronx; 10461; NY; USA (US) the whole document	1-32
A	WESCH D ET AL: "Comparative analysis of.alpha..beta. and.gamma..delta. T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1997; VOL.27 (4); PP.952-956, XP002102419 Paul Ehrlich Institute;Department Immunology; Langen; D-63225; Germany (DE) the whole document	1-32
A	BUERK M R ET AL: "Human V.gamma.9-V.delta.2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1995; VOL.25 (7); PP.2052-8, XP002102420 University Hospital;Experimental Immunology, Department of Research; Basel; CH-4031; Switz. (CH) the whole document	1-32
A	SCHOEL B ET AL: "Phosphate is essential for stimulation of V.gamma.9V.delta.2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1994; VOL.24 (8); PP.1886-92, XP002102421 University of Ulm;Department of Immunology; Ulm; Germany (DE) the whole document	1-32
A	DHE-PAGANON S ET AL: "MECHANISM OF MEVALONATE PYROPHOSPHATE DECARBOXYLASE: EVIDENCE FOR ACARBOCATIONIC TRANSITION STATE" BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 4, 15 November 1994 (1994-11-15), pages 13355-13362, XP000616265 * page 13356, compound II *	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520673 A	03-08-1995	FR 2715660 A	04-08-1995
US 5639653 A	17-06-1997	US 5902793 A	11-05-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la recherche internationale No  
PCT/FR 99/02058

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>		
CIB 7	C07F9/09	C07H19/10 C12N5/06 A61K31/66 A61K49/00
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07F C07H C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 20673 A (C.N.R.S.) 3 août 1995 (1995-08-03) cité dans la demande le document en entier	1-32
A	US 5 639 653 A (BARRY R. BLOOM) 17 juin 1997 (1997-06-17) cité dans la demande le document en entier	1-32
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 décembre 1999		11/01/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Beslier, L

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De le internationale No  
PCT/FR 99/02058

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>TANAKA Y ET AL: "Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human.gamma..delta. T cells" NATURE (LONDON) (NATUAS,00280836);1995; VOL.375 (6527); PP.155-8, XP002102418 Albert Einstein College Medicine;Howard Hughes Medical Inst.; Bronx; 10461; NY; USA (US) le document en entier</p>	1-32
A	<p>WESCH D ET AL: "Comparative analysis of.alpha..beta. and.gamma..delta. T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1997; VOL.27 (4); PP.952-956, XP002102419 Paul Ehrlich Institute;Department Immunology; Langen; D-63225; Germany (DE) le document en entier</p>	1-32
A	<p>BUERK M R ET AL: "Human V.gamma.9-V.delta.2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1995; VOL.25 (7); PP.2052-8, XP002102420 University Hospital;Experimental Immunology, Department of Research; Basel; CH-4031; Switz. (CH) le document en entier</p>	1-32
A	<p>SCHOEL B ET AL: "Phosphate is essential for stimulation of V.gamma.9V.delta.2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand" EUR. J. IMMUNOL. (EJIMAF,00142980);1994; VOL.24 (8); PP.1886-92, XP002102421 University of Ulm;Department of Immunology; Ulm; Germany (DE) le document en entier</p>	1-32
A	<p>DHE-PAGANON S ET AL: "MECHANISM OF MEVALONATE PYROPHOSPHATE DECARBOXYLASE: EVIDENCE FOR ACARBOCATIONIC TRANSITION STATE" BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 4, 15 novembre 1994 (1994-11-15), pages 13355-13362, XP000616265 * page 13356, composé II *</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Office Internationale No

PCT/FR 99/02058

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520673 A	03-08-1995	FR 2715660 A	04-08-1995
US 5639653 A	17-06-1997	US 5902793 A	11-05-1999